Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 543- 559

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر - آبان ۱۴۰۱ ص.۵۵۹-۵۴۳

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir
Full Research Paper

Development of an analytical approach for determination of acrylamide content in roasted date seed varieties

Paniz Khaloo Kermani[1], Marzieh Moeenfard*[2], Reza Farhoosh[3], Arminda Alves[4]

Received: 2021.07.24
Revised: 2021.08.23
Accepted: 2021.09.07
Available Online: 2023.01.04

How to cite this article:
Khaloo Kermani, P., Moeenfard, M., Farhoosh, R., Alves, A. (2022). Development of an analytical approach for determination of acrylamide content in roasted date seed varieties. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (4), 543-559.

Abstract

Introduction: Date seed are considered as a valuable by-product from *Phoenix dactylifera L.* which played an important role in the economy and social life of the people of the Middle East and North Africa region. They consist mostly of carbohydrates, fatty acids and proteins as well as phenolic compounds. Despite the presence of various beneficial bioactive compounds, they are usually discarded or are utilized as animal fodder. Therefore, explore the effective methods to incorporate date seeds in the human diet is a great of interest. Roasting provides a low cost and easy approach to add value to these wastes as roasted date seed powder is being used in the Arabian region to make “date seed coffee”. However, along with color and aroma changes, carcinogenic substance such as acrylamide may also formed during the roasting process. To date, no data have been published on the analysis of acrylamide in the roasted date seeds and respective brews. Therefore, the objective of the present study was development of an analytical method for determination of acrylamide in various date seeds varieties and their respective moka brews for the first time. Besides, other parameters related to the roasting process such as the color parameters and melanoidins content were also determined and compared with values obtained from Arabica coffee.

Materials and methods: For this purpose 5 different varieties of roasted date seeds including Shahani, Zahedi, Kabkab, Mazafati and Estamaran as well as Arabica coffee were used for coffee brewing. For acrylamide determination in solid samples, they were firstly extracted using hot deionized water. Afterwards, 5 mL of sample (extract or coffee brew) was placed in a 15 mL falcon and extraction solvents including acetonitrile (10 mL), hexane (5 mL) along with 1 g of NaCl and 4 g of $MgSO_4$ were added. After mixing on vortex for 1 min and centrifugation (5 min, 5000 rpm), 2 mL of the supernatant was cleaned using appropriate combination of sorbents (100 mg PSA, 50 mg C18 and 50 mg SAX) along with 0.30 g of $MgSO_4$.The cleaned supernatant was filtered and analyzed using high-performance liquid chromatography coupled with a photodiode array detector (HPLC-PDA) at 202 nm. The injection volume was 20 µL. The chromatographic separations were performed on a Eurospher 100-5 C18 column (250× 4.6 mm). Optimization was performed according to the type of organic solvent (acetonitrile and methanol), the percentage of organic solvent in the mobile phase (10, 5, 3% v/v) and the flow rate (0.1, 0.7, 0.5 mL/min). The color parameters (using photography and help of ImageJ software) and melanoidin content (spectrophotometrically at 420 nm) were also determined.

Results and discussion: The results indicated that the water/acetonitrile with a ratio of 97:3 and a flow rate of 0.7 mL/min permitted the acceptable separation of the acrylamide peak from the interfering compounds. The LOD and LOQ of optimized analytical method were 9.1 and 30.62 µg/kg, respectively. The suggested HPLC/PDA method is promising

1, 2 and 3. MSc Student, Assistant Professor, Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.
4. LEPABE - Faculty of Engineering of University of Porto.
(*Corresponding Author Email: moeenfard@um.ac.ir)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.71556.1072

for analysis in order to guarantee the quality control of acrylamide. The presence of acrylamide in all roasted date seeds was observed. Accordingly, acrylamide content in Arabica coffee (1825.23± 17.44 µg/kg) was significantly higher than those obtained from date seeds varieties. The amount of acrylamide in different types of date seeds varied from 360.99± 4.15 to 129.43± 2.37 µg/kg, being Kabkab and Mazafati as the highest and lowest values, respectively. Moka brews prepared from roasted date seeds demonstrated the presence of acrylamide in the range of 25-68 µg/L. The highest level of melanoidin were observed in Arabica coffee followed by Shahani, Zahedi, Kabkab, Mazafati and Estamaran, respectively. In the most cases, an inverse relationship was observed between the acrylamide and melanoidin content in roasted date seeds. For example, Shahani had low acrylamide and high melanoidin content. The study of color parameters revealed that the parameters a^* and b^* largely follow the pattern of melanoidin, so with increasing the amount of a^* and b^*, the amount of melanoidin also increased in the samples.

Keywords: Acrylamide, Arabica coffee, Roasting process, Melanoidins.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 4, Oct- Nov. 2022, p. 543- 559

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۱ ص.۵۵۹-۵۴۳

مقاله علمی-پژوهشی

توسعه یک روش آنالیز جهت تعیین محتوای آکریل‌آمید در واریته‌های هسته خرمای برشته

پانید خالوکرمانی[۱]- مرضیه معین‌فرد[۲]*- رضا فرهوش[۳]- آرمیندا آلوش[۴]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۰۲
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۶/۰۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۱۶

چکیده

آکریل‌آمید از جمله ترکیبات نامطلوب است که طی برشته کردن هسته خرما تولید می‌شود. با توجه به مضرات احتمالی آکریل‌آمید بر سلامت مصرف‌کنندگان، تعیین مقدار آن توسط HPLC-PDA در پودر و نوشیدنی موکا حاصل از پنج نوع واریته هسته خرما برشته شده در مقایسه با قهوه عربیکا برای اولین بار در این پژوهش مورد مطالعه قرار گرفت. روش آنالیز به جهت نوع حلال آلی (استونیتریل و متانول)، درصد حلال آلی (۱۰، ۵، ۳ درصد حجمی/ حجمی) و سرعت جریان (۱/۰، ۰/۷، ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه) بهینه شد. همچنین پارامترهای رنگی و میزان ملانوئیدین انواع نوشیدنی هسته خرمای برشته در مقایسه با نوشیدنی قهوه عربیکا مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که ترکیب آب/استونیتریل با نسبت ۳:۹۷ و سرعت جریان ۰/۷ میلی‌لیتر بر دقیقه، شرایط بهینه را جهت جداسازی پیک آکریل آمید فراهم می‌آورد. محتوای آکریل‌آمید پودر هسته خرمای کبکاب، استعمران، زاهدی، شاهانی و مضافتی به‌ترتیب ۴/۱۵ ±۳۶۰/۹۹، ۵/۹۸ ±۳۰۱/۰۷، ۹۷/۷۱± ۲۹۲/۴، ۵۵/۲۵± ۱۶۷/۳ و ۲/۳۷± ۱۲۹/۴۳ میکروگرم بر کیلوگرم به‌دست آمد که به‌طور معنی‌داری کمتر از قهوه عربیکا (۱۷/۴۴± ۱۸۲۵/۲۳ میکروگرم بر کیلوگرم) بود. نوشیدنی موکای حاصل از هسته خرمای برشته نیز حاوی ۶۸ -۲۵ میکروگرم بر لیتر آکریل‌آمید بود. میزان ملانوئیدین در محدوده ۱۱/۸۱ -۲/۸۰ گرم در ۱۰۰ گرم به‌دست آمد که بیشترین و کمترین مقدار به‌ترتیب در قهوه عربیکا و هسته خرمای استعمران گزارش شدند. همچنین بررسی پارامترهای رنگی نشان داد پارامترهای a^* و b^* تا حدی زیادی از الگوی ملانوئیدین پیروی می‌کنند، به‌طوری‌که با افزایش میزان a^* و b^*، میزان ملانوئیدین هم در نمونه‌ها افزایش یافت.

واژه‌های کلیدی: آکریل‌آمید، هسته خرما، قهوه عربیکا، برشته کردن، ملانوئیدین

مقدمه

خرما با نام علمی *Phoenix dactylifera L.*، یکی از محصولات مهم و شناخته شده کشاورزی در سراسر جهان، به‌ویژه خاورمیانه و شمال آفریقا است که از دوران باستان در رژیم غذایی انسان وجود داشته است. درحالیکه میوه خرما به دلیل ارزش غذایی بالا در قالب محصولات قنادی متنوع به بازار عرضه می‌گردد، هسته خرما که تقریبا ۱۰ تا ۱۵ درصد از وزن میوه را شامل می‌شود، از ضایعات این صنعت به شمار رفته و غالبا در ریخته می‌شود (Bijami et al. 2020, Hilary et al. 2020).

طبق آمار سازمان جهانی خوار و بار و کشاورزی (FAO[۴]) تولید جهانی خرما در سال ۲۰۱۹، در حدود ۹ میلیون تن برآورد شده که از این میان مصر، عربستان سعودی و ایران به‌ترتیب با ۱۷، ۱۶ و ۱۴ درصد، بزرگترین تولیدکنندگان خرمای جهان به‌شمار می‌روند. با توجه به این آمار و متوسط وزن هسته خرما، تخمین زده می‌شود که در سال ۲۰۱۹ حدوداً ۱/۵ میلیون تن هسته خرما به‌عنوان ضایعات بخش‌های مختلف (اعم از تازه خوری یا ضایعات حاصل از صنایع فرآوری) تولید شده باشد (FAO 2019). هسته خرما یا به‌عنوان مکمل در خوراک دام مورد استفاده قرار می‌گیرد و یا به‌طورکلی دور ریخته می‌شود که این امر منجر به آلودگی محیط زیست می‌گردد (Al-Farsi Mohamed; Ali and Lee 2008). بسته به نوع میوه خرما، بر اساس درصد وزنی/وزنی هسته خرما حاوی ۳-۵ درصد رطوبت، ۵/۵- ۲/۵۹ درصد پروتئین، ۵/۹۲ -۵/۰۲ درصد روغن، حدود ۸۶- ۸۴ درصد کربوهیدارت و ۱/۱۶- ۰/۸۹ درصد خاکستر است (Al-Farsi Mohamed et al. 2007). لازم به ذکر است که مقادیر بالاتر روغن (۸/۶ درصد) و پروتئین

۱، ۲ و۳- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۴- استاد، دانشکده مهندسی دانشگاه پورتو.
* - نویسنده مسئول: Email: moeenfard@um.ac.ir
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.71556.1072
4 Food and Agriculture Organization (FAO)

۱۱/۰۹ درصد) نیز در برخی منابع گزارش شده است (Babiker et al. 2020). به‌علاوه، هسته خرما مقادیر بالایی از ترکیبات فنولی (۳۱۰۲ تا ۴۴۳۰ میلی‌گرم گالیک‌اسید بر ۱۰۰ گرم وزن خشک هسته خرما) و خصوصیات آنتی‌اکسیدانی (۵۸۰ تا ۹۲۹ میکرومول ترولوکس بر ۱۰۰ گرم وزن خشک هسته خرما) را شامل می‌شود که به‌واسطه آن مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است (Maqsood et al. 2020). از تاثیرات مثبت هسته خرما بر سلامت می‌توان به خواص ضدالتهابی (Bouhlali et al. 2020)، ضددیابتی و ضدسرطانی (Habib et al. 2014) آن اشاره کرد. بنابراین با توجه به خواص سلامتی‌زایی هسته خرما و با در نظر گرفتن این موضوع که هسته خرما از ضایعات صنعت فرآوری خرما به‌دست می‌آید، عدم استفاده از این منبع سرشار از مواد مغذی، به لحاظ اقتصادی نیز توجیه پذیر نیست.

برشته کردن هسته خرما منجر به تولید ترکیبات آروماتیک مانند انواع الکل‌ها و آلدهیدها می‌شود که مشابه آن‌ها در دانه قهوه نیز وجود دارد و برای کسانی که می‌خواهند بدون دریافت مقادیر بالای کافئین، از طعم و رایحه‌ی قهوه لذت ببرند، مناسب است. بدین منظور، مردم در کشورهای عربی مانند عربستان سعودی و امارات، از پودر هسته خرمای برشته جهت تهیه نوشیدنی جایگزین قهوه استفاده می‌کنند. مصرف این نوشیدنی از اثرات منفی قهوه بر سلامتی مانند افزایش فشار خون، بی خوابی، سوء هاضمه و اضطراب ناشی از مقادیر بالای کافئین، جلوگیری می‌کند (Fikry Mohammad et al. 2020).

همانطور که در بالا اشاره شد، اصلی‌ترین مرحله جهت تهیه این نوع نوشیدنی، برشته کردن است. این فرآیند موجب ارتقاء عطر و طعم نوشیدنی، از بین رفتن آلاینده‌ها و میکروارگانیسم‌های نامطلوب و افزایش ماندگاری آن می‌شود. همچنین برشته کردن منجر به غیرفعال شدن آنزیم‌هایی می‌شود که تسریع نابودی مواد مغذی را به دنبال دارند (Fikry Mohammad et al. 2019b). اگرچه تغییرات شیمیایی و فیزیکی رخ داده در حین برشته کردن هسته خرما به‌طور کامل توصیف نشده است، اما منطقی است که فرض کنیم برخی از این تغییرات ممکن است مشابه آنچه در برشته کردن قهوه اتفاق می‌افتد، باشد (Ghnimi et al. 2015). برشته کردن قهوه سبز معمولاً در محدوده دمایی ۱۸۰ الی ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد انجام می‌شود که تغییرات قابل توجه در خصوصیات شیمیایی، فیزیکی و حسی دانه‌های قهوه را به دنبال خواهد داشت. در حین فرآیند برشته شدن، واکنش‌های موازی و متوالی شامل واکنش میلارد، تجزیه قند (کارامل‌سازی) و اکسیداسیون لیپیدها اتفاق می‌افتد. علاوه بر تقویت رنگ، عطر و طعم، که از ویژگی‌های معمول موثر بر مقبولیت قهوه هستند، ترکیبات نامطلوب نیز در نتیجه این واکنش‌ها ایجاد می‌شوند (Hamzalıoğlu and Gökmen 2020).

آکریل‌آمید یکی از این ترکیبات نامطلوب است که در نتیجه فرآیند برشته شدن قهوه شکل می‌گیرد و به‌عنوان یک ماده سرطان‌زا احتمالی شناخته می‌شود (WHO, 1994). آژانس بین‌المللی تحقیقات روی سرطان (IARC[1]) نیز آکریل‌آمید را در زمره ترکیبات سرطان‌زا و جهش‌زا بالقوه انسانی (گروه A۲) طبقه‌بندی کرده است (Badoud et al. 2020). آکریل‌آمید به‌لحاظ ساختاری یک جامد بلوری، بی‌بو، بی رنگ، با وزن مولکولی کم است که یک گروه وینیل آبدوست واکنش پذیر دارد. آکریل‌آمید در نتیجه واکنش میلارد و حین حرارت دادن محصولات غذایی ایجاد می‌شود و نتیجه واکنش میان آمینواسیدها و قندهای احیاکننده است. با توجه به مصرف بالای قهوه در جهان (حدودا ۱۶۶ میلیون بسته ۶۰ کیلوگرمی در سال ۲۰۲۱–۲۰۲۰) (ICO, 2021)، سازمان ایمنی غذایی اروپا (EFSA)[2]، قهوه را یکی از منابع اصلی دریافت آکریل‌آمید در نظر گرفته است (Hamzalıoğlu and Gökmen, 2020). همان‌طور که در بالا نیز اشاره شد، امروزه مصرف قهوه هسته خرما به سرعت در کشورهای عربی و همچنین سایر کشورهای دنیا در حال رشد است. در نتیجه تعیین میزان آکریل‌آمید در این نوشیدنی نوظهور که به روشی مشابه قهوه، برشته و استخراج می شود، به لحاظ سلامتی مصرف‌کنندگان از اهمیت بالایی برخوردار است.

با توجه به خطر سرطان‌زایی آکریل‌آمید و اهمیت اندازه‌گیری آن در محصولات غذایی، تکنیک‌های کروماتوگرافی به‌عنوان اصلی‌ترین روش شناسایی و تعیین مقدار آن در نظر گرفته می‌شوند. ضرورت مشتق‌سازی در کروماتوگرافی گازی منجر به طولانی شدن فرآیند آنالیز می‌شود. همچنین درجه حرارت‌های بالای تزریق در این روش ممکن است منجر به تولید آکریل‌آمید و در نتیجه به‌دست آوردن نتایج نادرست شود (Wenzl et al. 2006). به لحاظ آشکارساز، در بیشتر مطالعات از آشکارساز طیف‌سنج جرمی همراه با کروماتوگرافی مایع یا گازی جهت تعیین مقدار آکریل‌آمید استفاده شده است که معمولا به ندرت در دسترس قرار دارد و علی‌رغم حساسیت بالا نیازمند ابزارهای گران‌قیمت و روش‌های آماده‌سازی پیچیده است. در این بین با توجه به در دسترس بودن آشکارساز مرئی– فرابنفش/آرایه دیود نوری (PDA[3]) در اکثر آزمایشگاه‌های آنالیز ترکیبات شیمیایی، امکان تشخیص آکریل‌آمید توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[4] به همراه این آشکارساز، یک مزیت محسوب می‌شود (Longhua et al. 2012, Samanipour et al. 2019). صرف نظر از روش بکارگیری، شناسایی و تعیین مقدار آکریل‌آمید در محصولات غذایی پیچیده مانند قهوه، نیازمند

1 International Agency for Research on Cancer (IARC)
2 European Food Safety Authority (EFSA)
3 UV-Vis/photodiode array detector (PDA)
4 High-performance liquid chromatography(HPLC)

آماده‌سازی‌های متعدد است (Cagliero et al. 2016). در سال‌های اخیر، روش‌های مدرن آماده‌سازی نمونه جهت به حداقل رساندن میزان مصرف حلال‌های آلی و نیز کاهش زمان استخراج، به شکل قابل توجهی توسعه یافته‌اند که در این بین روشی سریع و آسان جهت استخراج آکریل‌آمید از نمونه‌های پیچیده مورد استفاده قرار می‌گیرد. این روش موثر شامل دو مرحله است: استخراج آنالیت با حلال آلی از نمونه اصلی و سپس استفاده از فاز جامد پراکنده[1]، جهت تمیز کردن عصاره استخراجی (Surma et al. 2017). با توجه به فوائد هسته خرما و افزایش مصرف آن، بررسی ویژگی‌های آن از جهت مقدار آکریل‌آمید از نقطه نظر سلامتی از اهمیت بالایی برخوردار خواهد بود. لازم به ذکر است تاکنون هیچ داده‌ای مبنی بر محتوای آکریل‌آمید واریته‌های مختلف هسته خرما برشته شده و همچنین نوشیدنی حاصل از آن‌ها، در منابع منتشر نشده است. از این رو، هدف از این پژوهش، بهینه‌سازی شناسایی و تعیین مقدار آکریل‌آمید پودر برشته هسته خرما و همچنین نوشیدنی موکا هسته خرما، به کمک کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا بود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، از پنج گونه خرمای کبکاب، شاهانی، مضافتی، استعمران و زاهدی و همچنین قهوه عربیکا (*Coffea arabica*– با درجه برشتگی متوسط) استفاده شد که همگی از فروشگاه‌های معتبر خریداری شدند. استاندارد آکریل‌آمید با درصد خلوص ≤۹۹ درصد و جاذب‌های آمین‌های اول و دوم[2](PSA)، اکتادسیل‌سیلات[3] (C18) و تبادل‌گر یونی قوی[4] (SAX)، هر سه با درصد خلوص ۹۹/۹۹ درصد از شرکت سیگما و نمک‌های کلرید سدیم و سولفات منیزیم بدون آب به ترتیب با درصد خلوص ۹۹/۵ و ۹۹ درصد از شرکت CDH هند خریداری شد. استونیتریل و هگزان از شرکت مرک آلمان و متانول از شرکت فیشر انگلستان (هر سه با درجه کروماتوگرافی) تهیه شدند.

آماده‌سازی نمونه

هسته‌ها بعد از جداسازی از میوه خرما، شسته و در هوای آزاد خشک شده (شکل ۱) و سپس در برشته کن آزمایشگاهی به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد برشته شدند. رطوبت هسته‌های خرمای برشته بعد از برشته شدن در محدوده‌ی ۰/۰۹– ۱/۹۰ درصد به‌دست آمد. لازم به ذکر است که به دلیل تفاوت در اندازه، شکل و ترکیبات شیمیایی واریته‌های هسته خرما، دما و زمان اعمال شده درجات مختلف برشتگی را در واریته‌های هسته خرما به دنبال داشت. هسته‌های خرمای برشته و دانه قهوه عربیکا جهت تهیه نوشیدنی توسط آسیاب، پودر و تا زمان استفاده در فریزر نگهداری شدند (Juhaimi et al. 2012). جهت تهیه عصاره پودری، ۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه با دمای ۳± ۶۰ درجه سانتی گراد به ۱ گرم پودر اضافه شده و بعد از ۵ دقیقه مخلوط شدن روی ورتکس، سانتریفوژ شده و فاز رویی جهت آنالیز جدا گردید. همچنین، به منظور تهیه نوشیدنی توسط موکا پات[5]، ۷/۵ گرم پودر انواع هسته خرما یا دانه قهوه عربیکا، داخل فیلتر فلزی مخصوص ریخته شد. کتری موکا با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه پر شد و تا جمع شدن تمام عصاره در ظرف رویی، روی حرارت قرار گرفت.



شکل ۱- آماده‌سازی هسته خرما استعمران

Fig. 1. Preparation of Estamaran variety date seed

استخراج آکریل‌آمید

استخراج آکریل‌آمید طبق روش Surma و همکاران (۲۰۱۷) با کمی تغییرات انجام گرفت (Surma et al. 2017). برای این منظور، ۵ میلی‌لیتر عصاره، به‌ترتیب با ۱۰ میلی‌لیتر استونیتریل و ۵ میلی‌لیتر هگزان مخلوط شد. ۴ گرم نمک سولفات منیزیم بدون آب و ۱ گرم نمک کلرید سدیم به نمونه اضافه شد و بعد از مخلوط شدن به مدت ۳ دقیقه روی ورتکس، به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شد. بعد از سانتریفوژ، ۳ فاز در لوله آزمایش تشکیل شدند که

1 dispersive solid-phase extraction (d-SPE)
2 Primary and secondary amine (PSA)
3 C18–octadecylsilane
4 Strong ion exchange (SAX)
5 Moka pot

به ترتیب از پایین به بالا شامل آب به همراه نمک‌ها، استونیتریل و هگزان بودند. فاز وسط که حاوی استونیتریل بود، جدا شده و به‌منظور پاکسازی با سه جاذب PSA (۱۰۰ میلی‌گرم)، C18 (۵۰ میلی‌گرم) و SAX (۵۰ میلی‌گرم) و نمک سولفات منیزیم بدون آب (۳۰۰ گرم) ترکیب شد و بعد مخلوط شدن، مجددا به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ گردید. مایع رویی بعد از فیلتر شدن با فیلترهای سرسرنگی از نوع PVDF[1] (قطر ۲/۵ سانتی‌متر، حفرات ۰/۴۵ میکرومتر) به دستگاه تزریق شد (Surma et al. 2017).

شناسایی و تعیین مقدار آکریل‌آمید با کمک کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

آنالیز کروماتوگرافی آکریل‌آمید با HPLC (KNAUER، آلمان)، به طریق فاز معکوس با کمک ستون Eurospher 100-5 C18 با طول ۲۵۰ و قطر ۴/۶ میلی‌متر انجام شد. روش کروماتوگرافی برای شناسایی آنالیت به لحاظ الف) نوع حلال، ب) نسبت حلال آلی به آب در فاز متحرک و ج) سرعت جریان فاز متحرک بهینه شد. جهت انتخاب فاز متحرک از دو ترکیب آب/ استونیتریل و آب/ متانول با نسبت‌های حجمی/ حجمی (۳:۹۷)، (۵:۹۵) و (۱۰:۹۰) استفاده شد. همچنین سه سرعت جریان ۰/۵، ۰/۷ و ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه جهت بهینه‌سازی مقایسه شدند. ۲۰ میکرولیتر از نمونه (عصاره تمیز شده یا محلول‌های استاندارد) به ستون تزریق شدند و شناسایی آکریل‌آمید به‌وسیله آشکارساز PDA در طول موج ۲۰۲ نانومتر انجام گرفت. پردازش داده های کروماتوگرافی نیز با نرم افزار EZChrom Elite انجام شد. آنالیز کیفی با مقایسه زمان بازداری آنالیت و ترکیب استاندارد و همچنین مقایسه طیف دو نمونه انجام گرفت. جهت تعیین مقدار آنالیت در نمونه مجهول، محلول استاندارد آکریل‌آمید در محدوده غلظتی ۳۰۰۰ -۵۰ میکروگرم بر لیتر در استونیتریل تهیه شده و به دستگاه تزریق شد. رسم منحنی کالیبراسیون با استفاده از سطح زیر پیک ترکیب استاندارد در مقابل غلظت جهت آنالیز کمی استفاده گردید.

اعتبار سنجی روش آنالیز کروماتوگرافی

این روش با در نظر گرفتن پارامترهای ضریب تعیین(R^2)، صحت (درصد بازیابی[2])، دقت (تکرار پذیری[3])، حداقل مقدار تشخیص (LOD)[4] و حداقل مقدار اندازه‌گیری (LOQ)[5] اعتبار سنجی شد.

- ضریب تعیین: ضریب تعیین با رسم منحنی کالیبراسیون و بررسی میزان خطی بودن تغییرات پاسخ دستگاه (سطح زیر نمودار) در مقابل غلظت‌های مختلف استاندارد محاسبه شد.
- دقت: جهت تعیین پارامتر دقت، محلول استاندارد آکریل‌آمید در سه سطح غلظتی ۷۵، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر لیتر، طی سه روز متوالی، با چهار تکرار، به دستگاه تزریق شد و با مقایسه تفاوت سطح زیر پیک هر غلظت طی این سه روز، ضریب تغییرات (CV[6]) محاسبه شد.
- صحت: پارامتر صحت با افزودن غلظت مشخصی از استاندارد آکریل‌آمید به نمونه اصلی (spike) و تزریق آن به دستگاه، بدست آمد. به این منظور حجم برابری از محلول استاندارد آکریل‌آمید در سه سطح غلظتی کم، متوسط و زیاد (۵، ۳۰ و ۶۰ میکروگرم بر لیتر) به نمونه اصلی اضافه شد. نمونه‌های غنی شده با آکریل‌آمید، تحت استخراج قرار گرفتند و بعد از تزریق عصاره‌های تمیز شده به دستگاه، با تقسیم جرم بدست آمده بر جرم مورد انتظار درصد بازیابی محاسبه شد.
- حداقل مقدار قابل تشخیص و اندازه‌گیری: جهت محاسبه مقادیر LOD و LOQ، از رابطه ۱ استفاده شد. در این فرمول S/N نسبت سیگنال به نویز (برای LOD ۳ و برای LOQ ۱۰)، c غلظ نمونه، N مقدار نویز زمان آنالیز نمونه شاهد و H مقدار سیگنال زمان آنالیز نمونه می‌باشد (Dias et al. 2010).

$$LOD, LOQ = c.S/N.N/H \qquad (۱)$$

تعیین مقدار ملانوئیدین

ملانوئیدین‌ها درشت مولکول‌های قهوه‌ای رنگ محلول در آب و حاوی نیتروژن هستند که طی واکنش میلارد تولید می‌شوند و ممکن است تا ۲۵ درصد وزنی/ وزنی از ماده خشک قهوه را شامل شوند. لذا در این پژوهش، مقدار این ترکیبات نیز در هسته خرمای برشته و نوشیدنی حاصله، محاسبه گردید. ملانوئیدین هنگام حرارت دادن ایجاد می‌شود و ساختار و ترکیب آن بسته به در دسترس بودن پیش‌سازها متفاوت است (Bekedam et al. 2006). از آنجایی که ساختار مولکولی ملانوئیدین‌ها هنوز مشخص نشده است، محلول استانداردی هم برای آن وجود ندارد. لذا در منابع منتشر شده، برای رسم منحنی کالیبراسیون از عصاره قهوه به‌عنوان محلول استاندارد استفاده می‌شود. به این منظور، ابتدا جهت تهیه محلول مادر، عصاره آبی قهوه عربیکا به نسبت ۱ به ۲ رقیق شد و سپس محلول مادر ده بار رقیق شد. بعد از قرائت جذب هر

1 Polyvinylidene fluoride (PVDF)
2 Percentage of Recovery
3 Repeatability
4 Limit of detection(LOD)
5 Limit of quantification(LOQ)
6 Coefficient of Variation (CV)

رقت در طول موج ۴۲۰ نانومتر توسط دستگاه طیف سنج فرابنفش–مرئی (Unico، آمریکا)، غلظت هر رقت با استفاده از فرمول اصلاح شده بیر–لامبرت (رابطه ۲) تعیین شد:

$$C=A/ba \qquad (۲)$$

در این فرمول C غلظت ملانوئیدین، A جذب رقت، b طول سل طیف‌سنج (۱ سانتی‌متر) و a ضریب خاموشی ویژه[۱] (۱/۱۲۸۹ لیتر بر گرم سانتی‌متر) است. جهت تعیین مقدار ملانوئیدین نوشیدنی موکا نیز نمونه‌ها به نسبت ۱ در۱۰ رقیق شدند و جذب آن‌ها در طول موج ۴۲۰ نانومتر قرائت شد. نتایج بعد از اعمال ضریب رقت، به صورت گرم ملانوئیدین در ۱۰۰ گرم نمونه بیان شد (Pérez-Hernández et al. 2012). لازم به ذکر است تمام اجزا ملانوئیدین دارای شاخص قهوه‌ای شدن بالایی هستند. در نتیجه مهمترین شاخص حضور محصولات واکنش میلارد، جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر است که بیانگر شاخص قهوه‌ای شدن و تشکیل رنگدانه‌های قهوه‌ای رنگ است (Madrau et al. 2010). لازم به ذکر است که در این طول موج تمامی ترکیبات قهوه‌ای رنگ دارای چگالی نوری خواهند بود برای همین از این طول موج در محاسبات مربوط به ملانوئیدین استفاده می‌شود (Hirano et al. 1996).

آزمون تعیین پارامترهای رنگی

جهت بررسی رنگ نمونه‌های پودری و نوشیدنی، تصویربرداری نمونه‌ها با استفاده از دوربین Canon-1000D انجام شد. به این منظور از ۱۱ لامپ ۱۰ واتی فلورسنت با زاویه ۴۵ درجه در کابین دوربین استفاده شد. تمامی نمونه‌ها با حجم و مقدار ثابت (نمونه پودری ۲۰ گرم و نمونه مایع ۱۰ میلی‌لیتر)، در فاصله۲۰ سانتی‌متری از لنز دوربین قرار گرفتند. بزرگنمایی لنز ۵۵ و سرعت شاتر روی $\frac{1}{5}$ تنظیم شد. عکس‌ها در فضای RGB[۲] با استفاده نرم افزار EOS Utility به کامپیوتر منتقل شدند. پارامترهای رنگی درفضای L^*، a^* و b^* با استفاده از نرم‌افزار ImageJ به‌وسیله plugin با عنوان Convertor-Space-Color استخراج شد. L^* میزان روشنایی از صفر (سیاه) تا ۱۰۰ (سفید) را مشخص می‌کند. همچنین پارامترهای a^* از ۱۰۰(قرمز) تا ۱۰۰– (سبز) و b^* از ۱۰۰(زرد) تا ۱۰۰– (آبی) اندازه‌گیری می‌شوند (Zheng et al. 2006).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در این پژوهش، تمامی آزمون‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی، با سه تکرار انجام شد. نتایج به‌دست آمده به کمک روش آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال (p<۰/۰۵) و با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد.

نتایج و بحث

بهینه سازی شرایط آنالیز آکریل‌آمید با کمک کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

شرایط بهینه شده نهایی دستگاه HPLC جهت شناسایی و تعیین مقدار آکریل‌آمید در جدول ۱ نشان داده شده است. شرایط بهینه امکان آنالیز آکریل‌آمید را در زمانی کمتر از پنج دقیقه فراهم کرد. آکریل‌آمید یک مولکول قطبی قوی با بازداری ضعیف است که معمولا آنالیز آن با ستون‌های غیرقطبی و یا قطبی ضعیف منجر به ظهور پیک با ظاهری نامناسب می‌شود (Zhang et al. 2007). با این حال، اکثر محققان به دلیل قطبیت بالای آکریل‌آمید، از کروماتوگرافی فاز معکوس استفاده کرده‌اند که به همین منظور در این پژوهش نیز از ستون غیرقطبی C18 استفاده شد.

باتوجه به اینکه استفاده از آب ۱۰۰ درصد حجمی، برای فاز متحرک منجر به پهن شدن بیش از حد پیک نمونه می‌شود (Wang et al. 2008) و از طرفی استفاده از آب بدون حضور حلال آلی کاهش طول عمر ستون کروماتوگرافی را در پی خواهد داشت، در پژوهش حاضر، بهینه سازی ترکیب فاز متحرک با استفاده از مخلوط آب/ متانول و آب/ استونیتریل با نسبت‌های حجمی/ حجمی (۳:۹۷)، (۵:۹۵) و (۱۰:۹۰) مورد آزمون قرار گرفت. کروماتوگرام‌های بدست آمده از آنالیز محلول استاندارد آکریل‌آمید با غلظت ۱ ppm با استفاده از فازهای متحرک متفاوت در شکل ۲ نشان داده شده است. تفاوت نسبت حلال‌های آلی مختلف، تاثیر مشابهی بر زمان بازداری داشت به طوری که در هر دو فاز متحرک با کاهش نسب حلال آلی از ۱۰ درصد حجمی به ۳ درصد حجمی، زمان بازداری افزایش یافت. طبق شکل ۲ (d,e,f)، حضور متانول در فاز متحرک، باعث عدم جداسازی مناسب پیک آکریل‌آمید و ناخالصی‌های موجود در نمونه هسته خرما و قهوه برشته شد که پهن شدن پیک استاندارد در هر سه سطح نسبتی آب/ متانول، این امر را تصدیق می‌کند، درحالی‌که ترکیب استونیتریل/ آب (شکل ۲– a,b,c)، توانایی مطلوبی در جداسازی پیک آکریل‌آمید و ناخالصی‌ها داشت و منجر به ظهور پیک‌هایی به مراتب بلندتر و باریک‌تر شد.

بررسی منابع نشان می‌دهد که اگر قدرت شست‌وشوی[۳] حلال نمونه تزریق شده، بیشتر از حلال فاز متحرک باشد، می‌تواند در جذب سطحی نمونه در سر ستون اختلال ایجاد کند و معمولا پهن شدن پیک

---

[1] Specific extinction coefficient
[2] Red, Green and Blue(RGB)
3 Elution Strength

به این امر نسبت داده می‌شود (Keunchkarian et al. 2006). در نتیجه با توجه به اینکه حلال محلول استاندارد تزریق شده، استونیتریل بود و قدرت استونیتریل بیشتر از متانول است، این خاصیت خود باعث پهن شدن پیک نمونه به هنگام استفاده از مخلوط آب/ متانول به‌عنوان فاز متحرک خواهد شد. پهن شدن پیک فرآیندی نامطلوب در کروماتوگرافی است که موجب کاهش کارایی ستون کروماتوگرافی می‌شود. هدف اصلی در کروماتوگرافی، تلاش برای هرچه باریک‌تر کردن پیک و درنتیجه جداسازی کامل پیک نمونه و تداخل‌گرها و افزایش حساسیت آنالیز است. انتخاب حلال مناسب فاز متحرک، نقش مهمی در به دام انداختن آنالیت و به حداقل رساندن تداخل ماتریکس نمونه دارد (Keunchkarian et al. 2006). نتایج این پژوهش نشان داد حلال استونیتریل نسبت به متانول توانایی بهتری در جداسازی پیک نمونه و تداخل‌گرها دارد. همچنین لازم به ذکر است که فشار وارد بر ستون توسط حلال آب/ متانول بیشتر از حلال آب/ استونیتریل بود که این امر به بیشتر بودن چگالی متانول نسبت به استونیتریل مربوط می‌شود. در نتیجه با توجه به پهن شدن شدید پیک، جداسازی نامطلوب و کاهش محسوس سطح پیک نمونه و افزایش فشار ستون هنگام استفاده از ترکیب آب/ متانول به‌عنوان فاز متحرک، ترکیب آب/ استونیتریل جهت آنالیز آکریل‌آمید در انواع هسته خرمای برشته انتخاب شد.

جدول ۱- شرایط HPLC-PDA جهت آنالیز آکریل‌آمید در هسته خرما و قهوه برشته شده

Table 1- The HPLC-PDA conditions for analyzing acrylamide in roasted date seed and roasted coffee

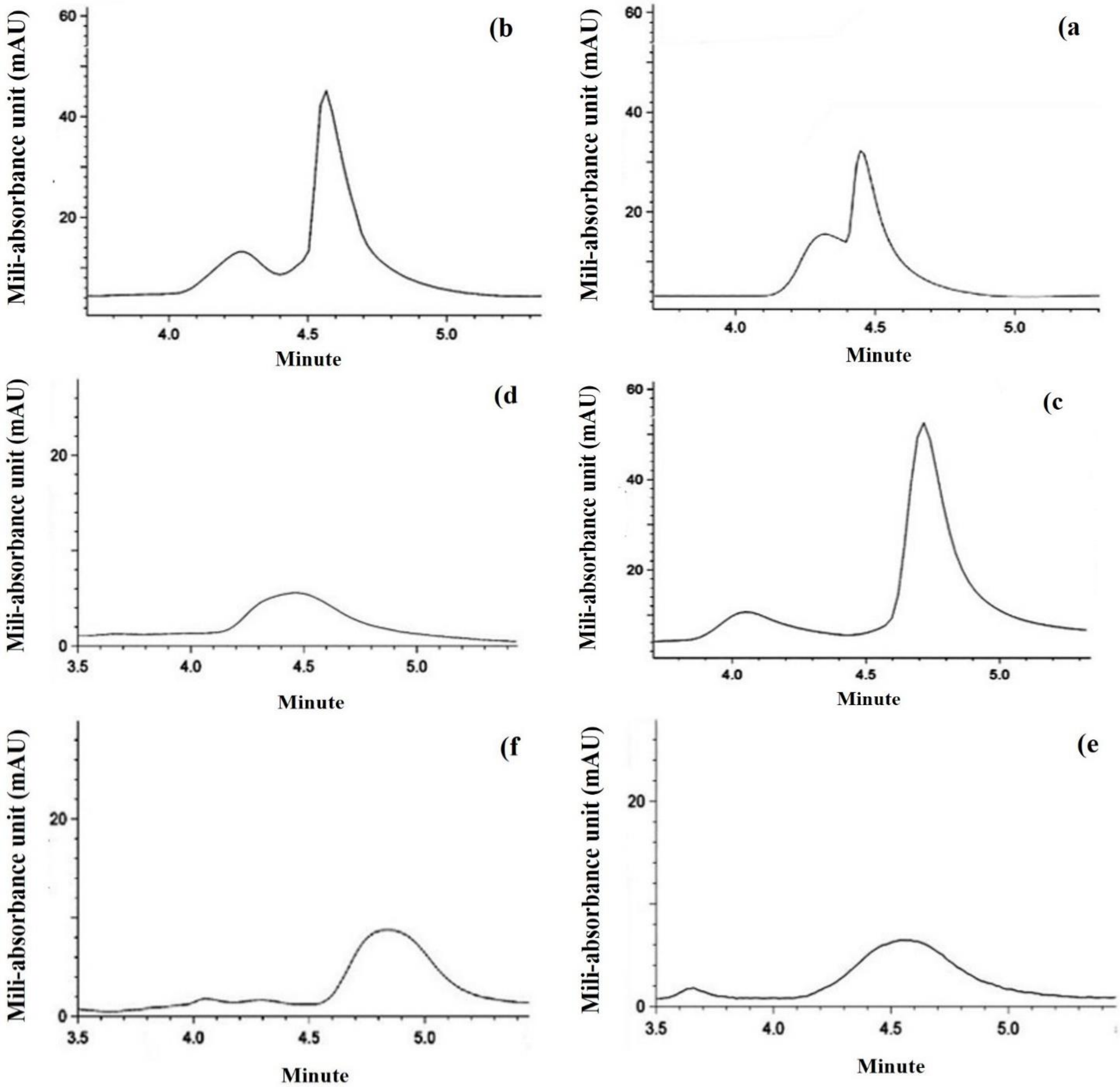
Mobile phase **فاز متحرک**	Water (97%) / Acetonitrile (3%)
Flow rate **سرعت جریان**	0.7 ml/min
Column temperature **دمای ستون**	25 °C
Injection volume **حجم تزریق**	20 µL
Wavelength **طول موج**	202 nm

نتایج مشابهی توسط Wang و همکاران (۲۰۰۸) گزارش شد. آن ها، جهت انتخاب فاز متحرک برای آنالیز آکریل‌آمید در انواع غذاهای سنتی چینی، مخلوط آب/ استونیتریل و آب/ متانول را مقایسه کردند. نتایج نشان داد جداسازی آکریل‌آمید و تداخل‌گرهای نمونه، به هنگام استفاده از متانول به عنوان فاز متحرک رضایت‌بخش نبود، درحالیکه استونیتریل توانایی مطلوبی در جداسازی پیک آکریل‌آمید و تداخل‌گرها داشت، به‌طوری‌که پیک آکریل‌آمید در حضور استونیتریل با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه، بعد از ۷ دقیقه ظاهر شد (Wang et al. 2008). این پژوهشگران نیز به سه دلیل از مخلوط آب/ استونیتریل به عنوان فاز متحرک استفاده کردند: ۱- استونیتریل در تشخیص طول موج‌های کوتاه‌تر (۲۰۲ نانومتر) حداقل تعداد پیک‌های تداخل‌گر را ایجاد کرد، ۲- کاهش فشار ستون با تغییر فاز متحرک از آب/ متانول به آب/ استونیتریل و ۳- توانایی بالا استونیتریل در جداسازی تداخل‌گرها. به طور کلی، اگرچه استفاده از مخلوط آب/متانول نیز به‌عنوان فاز متحرک جهت آنالیز آکریل‌آمید قهوه برشته شده در برخی منابع گزارش شده است (Mastovska and Lehotay 2006, Rattanarat et al. 2021)، اما کاربرد آب/ استونیتریل به این منظور رایج‌تر بوده و بیشتر پیشنهاد می‌شود (Bagdonaite et al. 2008, Bertuzzi et al. 2020, Wang et al. 2008). با توجه به ترکیب شیمیایی هسته خرما، نتایج پژوهش حاضر نیز بیانگر مناسب بودن ترکیب آب/ استونیتریل برای آنالیز آکریل‌آمید در عصاره هسته خرمای برشته است که تا کنون در منابع دیگر به آن اشاره نشده بود.

با توجه به شکل ۲ افزایش نسبت آب در فاز متحرک، تاثیر مشهودی بر جداسازی آکریل‌آمید و ناخالصی‌ها داشت، به‌طوری‌که با کاهش نسبت آب از ۹۷ درصد حجمی به ۹۰ درصد حجمی، جداسازی نمونه و ناخالصی‌ها کم‌تر و در نتیجه پیک استاندارد پهن‌تر شد. با توجه به جداسازی مطلوب پیک نمونه و تداخل‌گرها و ظهور پیک بلندتر و باریکتر، به هنگام استفاده از مخلوط آب/ استونیتریل (۳:۹۷ حجمی/ حجمی)، این ترکیب به عنوان فاز متحرک بهینه انتخاب شد (شکل ۲-a).

شکل ۳ کروماتوگرام‌های حاصل از آنالیز آکریل‌آمید با سه سرعت جریان ۰/۵، ۰/۷ و ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه را نشان می‌دهد. با استفاده از سرعت جریان ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه، جداسازی نمونه و تداخل‌گرها رضایت‌بخش نبود، به طوری که پیک نمونه پهن و زمان بازداری طولانی شد. افزایش سرعت جریان از ۰/۵ به ۰/۷ میلی‌لیتر بر دقیقه، علاوه بر کاهش زمان بازداری از ۵/۲ به ۴/۷ دقیقه، منجربه تفکیک

پذیری مطلوب آنالیت و تداخل‌گرها، ظهور پیک باریک و بلند و در نتیجه بهبود حساسیت روش شد. این درحالی است که افزایش سرعت جریان به ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه، علی‌رغم کاهش اندک زمان بازداری، مانع از جداسازی مناسب پیک نمونه و تداخل‌گرها شد و حساسیت آنالیت به وضوح کاهش یافت. به این ترتیب سرعت جریان ۰/۷ میلی‌لیتر بر دقیقه به عنوان سرعت جریان بهینه انتخاب گردید.



شکل ۲- کروماتوگرام‌های حاصل از بهینه‌سازی ترکیب فاز متحرک: a) آب/استونیتریل (۱۰:۹۰)، b) آب/استونیتریل (۵:۹۵)، c) آب/استونیتریل (۳:۹۷)، d) آب/متانول (۱۰:۹۰)، e) آب/متانول (۵:۹۵) و f) آب/متانول (۳:۹۷). سرعت جریان: ۰/۷ میلی‌لیتر بر دقیقه

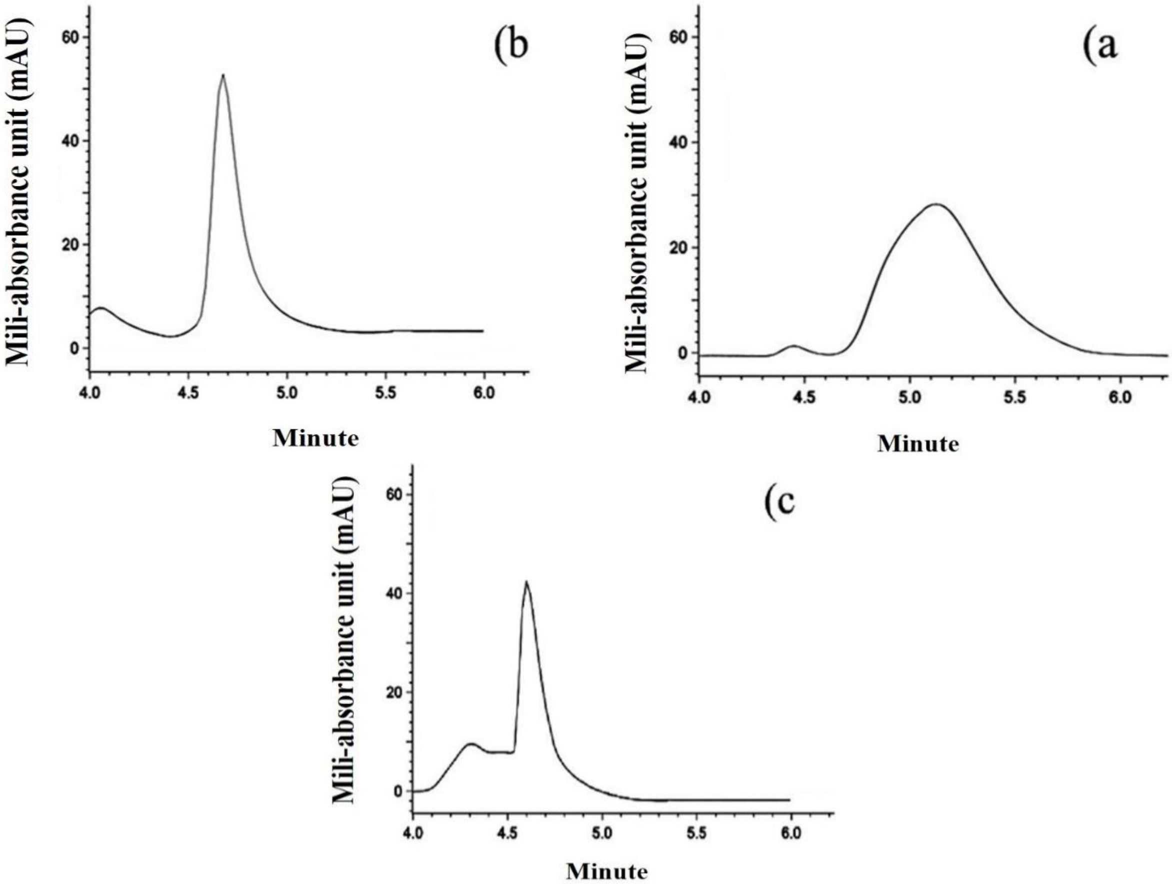
Fig. 2. Chromatograms obtained from various mobile phase composition icluding: a) water/acetonitrile (90:10, v/v), b) water/acetonitrile (95:5, v/v), c) water/acetonitrile (97:3, v/v), d) water/methanol (90:10, v/v), e) water/methanol (95:5, v/v) .and f) water/methanol (97:3, v/v). Flow rate: 0.70 mL/min

اعتبارسنجی روش آنالیز

اعتبارسنجی روش، فرآیندی است برای انجام ارزیابی‌های متعدد که به‌منظور تأیید مناسب بودن یک سیستم آنالیز و توانایی ارائه داده‌های تحلیلی سودمند و صحیح طراحی شده است. اعتبارسنجی روش‌های آنالیز دستگاهی، یک اصل جهت تعیین مقدار ترکیبات شیمیایی به حساب می‌آید. نتایج اعتبارسنجی روش مورد استفاده در

این پژوهش بیانگر کارایی قابل قبول آن در آنالیز آکریل‌آمید بود. در نتیجه در ادامه، پارامترهای اعتبارسنجی آنالیز آکریل‌آمید توسط HPLC-PDA با استفاده از روش بهینه شده در مرحله قبل، با تعیین پارامترهای دقت (تکرارپذیری)، صحت (درصد بازیابی)، ضریب تعیین (خطی بودن پاسخ در برابر غلظت) و حداقل مقدار قابل تشخیص (LOD) و اندازه‌گیری (LOQ) مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج در جدول ۲ نشان داده شد.

نتایج بیان‌گر خطی بودن پاسخ دستگاه به آکریل‌آمید در محدوده غلظتی ۵۰ تا ۳۰۰۰ میکروگرم بر لیتر خطی بود به نحوی که ضریب تعیین ۰/۹۹۹۹ به‌دست آمد. نتایج ارزیابی دقت روش که با ضریب تغییرات (CV) بیان گردید نشان داد که تکرار پذیری این داده‌ها قابل قبول بود به طوری که ضریب تغییرات هر سه غلظت، کمتر از ۲ درصد گزارش شد. مقادیر LOD و LOQ با استفاده از سیگنال به نویز ۳ و ۱۰ به‌ترتیب ۹/۱ و ۳۰/۶۲ میکروگرم بر کیلوگرم محاسبه شد که در محدوده منحنی کالیبراسیون قرار داشته و با در نظر گرفتن مقدار آکریل آمید موجود در نمونه مجهول، قابل قبول گزارش شدند. روش استخراج بکار گرفته شده منجر به درصد بازیابی ۱۰۳ درصد شد که بیانگر کارایی روش بکار گرفته شده جهت استخراج و آنالیز آکریل‌آمید می‌باشد.



شکل ۳- کروماتوگرام‌های حاصل از بهینه‌سازی سرعت جریان فاز متحرک: a) سرعت جریان ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه، b) سرعت جریان ۰/۷ میلی‌لیتر بر دقیقه و c) سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه. ترکیب فاز متحرک: آب/استونیتریل (۳:۹۷).

Fig. 3. Chromatograms obtained from the optimization of the flow rate: a) 0.50 mL/min, b) 0.70 mL/min, c) 1.00 mL/min. Mobile phase composition: water/acetonitrile (97:3, v/v).

Endeshaw و همکاران (۲۰۲۰)، مقادیر LOD و LOQ آنالیز آکریل‌آمید قهوه عربیکا توسط HPLC-DAD[1] را به‌ترتیب ۵ و ۲۰/۴۰ میکروگرم بر کیلوگرم گزارش کردند که بیانگر حساسیت روش مورد استفاده است (Endeshaw and Belay 2020). همچنین، Samanipour و همکاران (۲۰۱۸)، مقادیر LOD و LOQ جهت آنالیز آکریل‌آمید چیپس سیب‌زمینی با HPLC-PDA را به ترتیب ۹ و ۲۷ میکروگرم بر کیلوگرم گزارش کردند که با داده‌های حاصل از این پژوهش همخوانی دارد (Samanipour et al. 2019). Surma و

1 Diode-Array Detector (DAD)

همکاران (۲۰۱۷)، مقدار درصد بازیابی آکریل‌آمید نمونه‌های قهوه فوری را ۹۵ درصد گزارش کردند که با توجه به یکسان بودن روش استخراج، نتایج این پژوهش را تائید می‌کند (Surma et al. 2017). به‌طورکلی، نتایج حاصل از این پژوهش، از نظر حداقل مقدار قابل تشخیص یا اندازه‌گیری و درصد بازیابی، با نتایج سایر محققان مطابقت دارد و مقادیر بدست آمده در محدوده قابل قبول قرار دارند، بنابراین روش استخراج و آنالیز مورد استفاده در پژوهش حاضر، توانایی لازم جهت قضاوت درمورد نتایج به‌دست آمده را دارند.

تعیین مقدار آکریل‌آمید انواع نمونه

آکریل‌آمید در هسته خرما برشته شده با کمک تطابق زمان بازداری و طیف حاصل از آنالیز نمونه واقعی با محلول استاندارد آکریل‌آمید، شناسایی شد (شکل ۴). نتایج بررسی میزان آکریل‌امید در دانه قهوه عربیکا و انواع گونه هسته خرمای برشته شده در جدول ۳ نشان داده شده است.

نمونه‌ها از نظر محتوی آکریل‌آمید تفاوت معناداری با هم داشتند (p<۰/۰۵). نتایج بیانگر وجود مقادیر کمتر آکریل‌آمید در انواع هسته خرما نسبت به قهوه عربیکا بود (جدول ۳)، به‌طوری‌که میزان آکریل‌آمید پودر و نوشیدنی موکا قهوه عربیکا به ترتیب ۱۷/۴۴ ±۱۸۲۵/۲۳ میکروگرم بر کیلوگرم و ۴/۰۸± ۳۴۵/۸۹ میکروگرم بر لیتر بدست آمد. مقدار آکریل‌آمید در انواع پودر هسته خرمای برشته نیز در محدوده ۳۶۰- ۱۲۹ میکروگرم بر کیلوگرم قرار داشت. همچنین نوشیدنی موکای حاصل از هسته خرما حاوی ۶۸- ۲۵ میکروگرم بر لیتر آکریل آمید بود.

جدول ۲- پارامترهای اعتبارسنجی آنالیز آکریل‌آمید در هسته خرما توسط HPLC-PDA

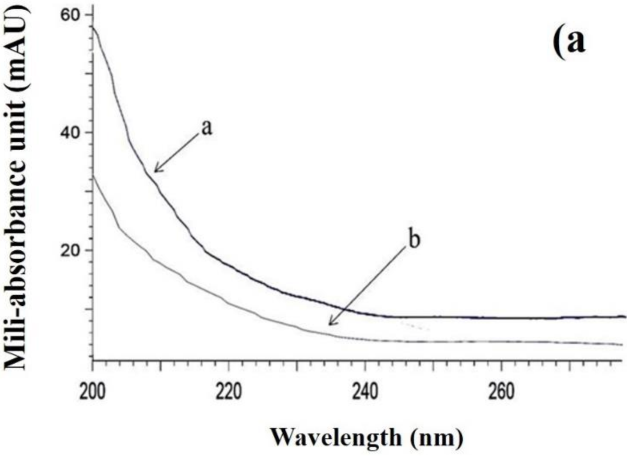
Table 2- Validation parameters for acrylamide analyzed by HPLC–PDA

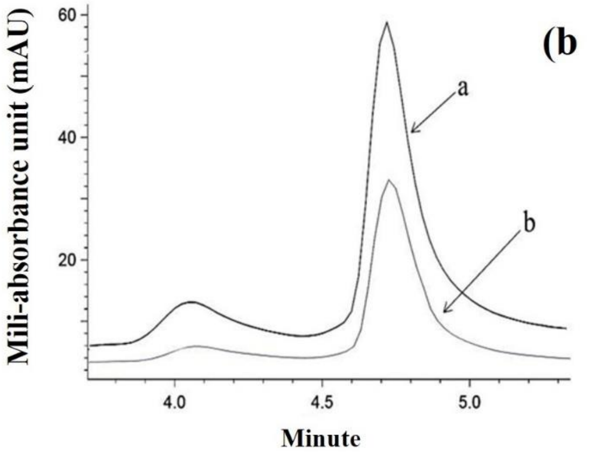
Linearity range (µg/L) **محدوده خطی منحنی کالیبراسیون**		50-3000		
coefficient of determination (R^2) **ضریب تعیین**		0.9999		
LOD (µg/L) **حداقل مقدار قابل تشخیص**		9.1		
LOQ (µg/L) **حداقل مقدار قابل اندازه گیری**		30.62		
Accuracy (Recovery) **صحت (درصد بازیابی)**		103%		
	Standards (mg/L) **استانداردها (mg/L)**	**75**	**100**	**200**
Precision **دقت**	**Intra-day (%CV)** **در یک روز**	6.03	2.11	2.00
	Inter-day (%CV) **طی سه روز متوالی**	2.69	2.92	1.51

تاکنون هیچ داده‌ای مبنی بر تعیین محتوی آکریل‌آمید در هسته خرمای برشته شده گزارش نشده است اما باتوجه به اینکه هسته خرما حاوی پروتئین و قندهای احیاکننده است، تشکیل آکریل‌آمید در اثر برشته شدن آن، دور از انتظار نیست (Juhaimi et al. 2012). آکریل‌آمید از محصولات اصلی واکنش میلارد است که طی حرارت دادن مواد غذایی حاوی قندهای احیاکننده و آمینواسید آسپارژین، تشکیل می‌شود (Alves et al. 2010). کمتر بودن میزان آکریل‌آمید در هسته خرما نسبت به قهوه عربیکا را می‌توان به کمتر بودن پیش سازهای آن در هسته خرما (خصوصا به لحاظ میزان آمینو اسیدها) نسبت داد (Juhaimi et al. 2012). ویژگی‌های هسته گونه‌های مختلف خرما با توجه به تنوع و شرایط محیطی متفاوت است. کوددهی خاک، آبیاری، دمای روزانه، مدت زمان رشد و سایر تیمارهای پس از برداشت (خشک شدن یا مرطوب شدن بیشتر میوه) عواملی هستند که می‌توانند بر خواص فیزیکی میوه‌های خرما تأثیر بگذارند. می‌توان تصور کرد که این عوامل به احتمال زیاد بر هسته‌های خرما نیز تأثیر می‌گذارد. بنابراین با توجه به تفاوت ترکیبات شیمیایی انواع مختلف هسته خرما، اختلاف میزان آکریل‌آمید در واریته‌های مختلف قابل توجیه است (Golshan Tafti et al. 2017). در پژوهش Alves و همکاران (۲۰۱۰)، میزان آکریل‌آمید انواع پودر قهوه ۵/۷۵ ±۱۳۱/۷۹ تا ۲۰/۳۷ ±۲۱۹۱/۱۸ میکروگرم بر کیلوگرم و اسپرسو قهوه ۱/۳ ±۲۲/۸ تا ۱۶/۶ ±۳۹۰/۰

میکروگرم بر لیتر گزارش شد که در محدوده نتایج حاصل از پژوهش حاضر قرار داشت (Alves et al. 2010). Basaran و همکاران (۲۰۲۰)، میزان آکریل‌آمید نوشیدنی فیلتر، اسپرسو، لاته و موکا حاصل از قهوه را به‌ترتیب ۱۶/۸، ۲۵/۵، ۳۴/۱ و ۷۲/۸ میکروگرم بر لیتر گزارش کردند (Başaran et al. 2020).

تشکیل آکریل‌آمید در قهوه به شدت تحت تاثیر شرایط برشته کردن است. در شروع حرارت‌دهی، مقدار آکریل‌آمید به سرعت افزایش می‌یابد و می‌تواند به ۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم برسد اما در ادامه خیلی زود کاهش می‌یابد، به همین دلیل با افزایش درجه برشتگی میزان آکریل‌آمید کاهش می‌یابد. بنابراین احتمال می‌رود که دانه‌هایی با برشتگی کمتر در مقایسه با انواع با برشتگی بالا، از محتوای آکریل‌آمید بالاتری برخوردار باشند. مطالعات نشان می‌دهد عوامل مختلفی همچون گونه قهوه، شرایط نگهداری، تخمیر و روش دم‌آوری می‌تواند بر شکل‌گیری آکریل‌آمید و میزان آن در نوشیدنی نهایی موثر باشند (Başaran et al. 2020).





شکل ٤- مطابقت زمان بازداری و طیف (طول موج ۲۰۲ نانومتر) محلول استاندارد ۱ ppm آکریل‌آمید و پودر هسته خرما کبکاب: Aa) طیف حاصل از محلول استاندارد، Ab) طیف حاصل از هسته خرما کبکاب، Ba) پیک محلول استاندارد، Bb) طیف حاصل از آنالیز پودر هسته خرما

Fig. 4. Comparing the retention time and spectrum (wavelength 202 nm) of acrylamide standard solution and roasted date seed (variety of Kabkab): aa) spectrum obtained from standard solution, ab) spectrum obtained from roasted date seed, ba) peak of acrylamide standard solution, Bb) peak of acrylamide in roasted date seed.

جدول ۳- میزان آکریل‌آمید در نمونه آسیاب شده و نوشیدنی موکای حاصله

Table 3- Acrylamide content in ground samples and their Moka brew

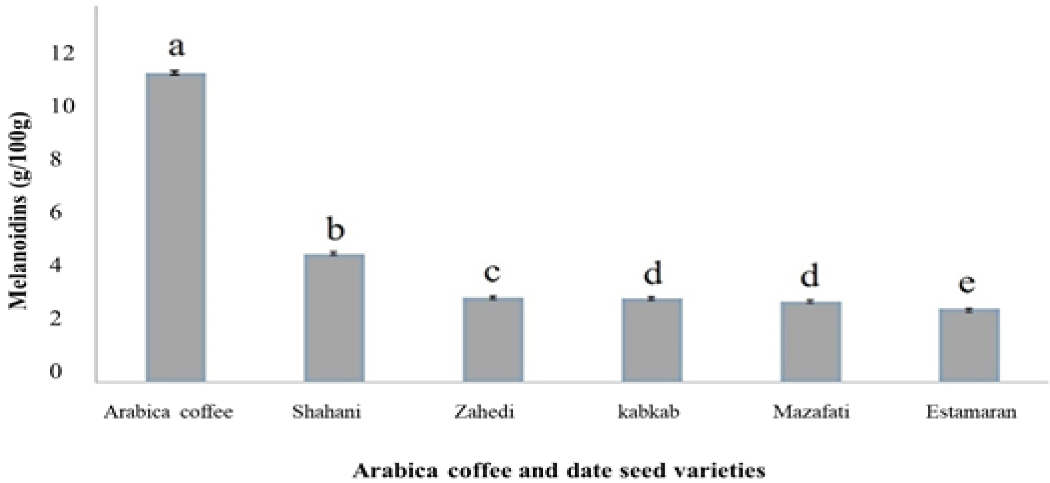
Samples نمونه	Ground samples (µg/kg) نمونه آسیاب شده	Moka (µg/L) موکا
Arabica coffee قهوه عربیکا	1825.23 ±17.44[a]	345.89±4.08[a]
Kabkab کبکاب	360.99 ±4.15[b]	68.06± 0.51[b]
Estamaran استعمران	301.07 ±5.98[c]	59.42 ±0.53[c]
Zahedi زاهدی	292.97± 4.71[c]	58.40± 0.68[c]
Shahani شاهانی	167.55± 3.25[d]	33.87± 0.20[d]
Mazafati مضافتی	129.43 ±2.37[e]	25.70 ±0.30[e]

*حروف(a,b,..) در هر ستون، بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

Different letters in a column denote significant differences (p<0.05)*

تعیین مقدار ملانوئیدین نوشیدنی موکا

ملانوئیدین‌ها ترکیبات پلیمری نیتروژن‌دار، آنیونی، ناهمگون و قهوه‌ای رنگ هستند که در مراحل پایانی واکنش میلارد تشکیل می شوند و در رنگ، طعم و بافت محصول نهایی دخیل هستند (Keunchkarian et al. 2006, Pastoriza et al. 2012). نتایج آنالیز آماری نشان داد، اختلاف معنی‌داری (p<۰/۰۵)، میان مقادیر ملانوئیدین نوشیدنی‌های موکا هسته خرما و قهوه عربیکا وجود دارد (شکل ۵). طبق نتایج به‌دست آمده بیشترین میزان ملانوئیدین به‌ترتیب مربوط به قهوه عربیکا، هسته خرما شاهانی، زاهدی، کبکاب، مضافتی و استعمران بود. Fikry و همکاران (۲۰۱۹) نیز حضور ملانوئیدین در قهوه هسته خرما را با تعیین شاخص قهوه‌ای شدن[1] و اندازه‌گیری جذب نوشیدنی رقیق شده (۵۰ میکرولیتر نوشیدنی در ۲ میلی‌لیترآب) در ۴۲۰ نانومتر نشان دادند. طبق نتایج این گروه از محققین، افزایش شدت برشته کردن، افزایش شاخص قهوه‌ای شدن را به دنبال داشت (Fikry et al. 2019a).



شکل ۵- مقادیر ملانوئیدین نوشیدنی موکا تهیه شده از قهوه عربیکا و واریته‌های مختلف هسته خرما.

حروف (a,b,..) در هر ستون، بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

Fig. 5. Melanoidin content of Moka drinks prepared from arabica coffee and different varieties of date seed. Letters (a,b,..) in each column indicate a significant difference at the level of 0.05.

به لحاظ میزان ملانوئیدین در قهوه، نتایج ما با یافته‌های Vignoli و همکاران (۲۰۱۱) اندکی تفاوت داشت. آن‌ها میزان ملانوئیدین قهوه عربیکا را در درجات برشتگی متفاوت بین ۱۹ الی ۲۹ گرم بر ۱۰۰ گرم قهوه گزارش کردند. این تفاوت در نتایج می‌تواند به روش متفاوت اندازه گیری ملانوئیدین در پژوهش آن‌ها مربوط باشد. همچنین این محققین از دما و فشار بالایی برای استخراج عصاره استفاده کرند که می‌تواند به استخراج بیشتر ملانوئیدین از نمونه نیز منجر شود (Vignoli et al. 2011). Pérez-Hernández و همکاران (۲۰۱۲) نیز مقدار ملانوئیدین قهوه فرانسه، ایتالیایی و فوری را به‌ترتیب۱/۷۰ ±۲۴/۷۴، ۱/۸۰ ±۲۴/۷۹ و ۰/۲۱ ±۶۷/۶۱ گرم در ۱۰۰ گرم نمونه گزارش کردند. Lopes و همکاران (۲۰۱۶) میزان ملانوئیدین در انواع قهوه اسپرسو (از نوع کپسول) را ۱۴۵– ۶۹ میلی‌گرم در فنجان (به‌طور متوسط ۴۰ میلی لیتر) گزارش کردند (Lopes et al. 2016) که با در نظر گرفتن وزن متوسط پودر قهوه در هر کپسول (۷-۵گرم)، به طور تقریبی معادل ۳- ۲ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم قهوه خواهد بود.

Baum و همکاران (۲۰۰۸)، نشان دادند که تقریبا ۹۰ درصد آکریل آمید موجود در قهوه به ترکیبات ماتریس قهوه متصل است و اغلب در اتصال با ترکیبات رنگ‌دار موجود در دانه قهوه استخراج می‌شود (Baum et al. 2008). در ادامه، Pastoriza و همکاران (۲۰۱۲) در تحقیقی واکنش میان آکریل‌آمید و ملانوئیدین را در یک سیستم مدل مورد بررسی قرار دادند. یافته‌های آن‌ها بیانگر کاهش آکریل‌آمید در حضور مقادیر بالای ملانوئیدین بود. آن‌ها گروه‌های آمینه هسته دوست ناشی از باقیمانده پروتئینی اسکلت ملانوئیدین را عامل این کاهش در میزان آکریل‌آمید در حین برشته کردن قهوه معرفی کردند. افزودن

1 Browning Index

اسیدهای آمینه آزاد (به غیر از آسپارژین به‌عنوان پیش‌سازهای آکریل آمید) مانند گلیسین، لیزین و سیستئین، می‌تواند غلظت آکریل‌آمید را در محصولات تحت تیمار حرارتی، کاهش دهد (Pastoriza et al. 2012). در پژوهش حاضر نیز در اغلب موارد، رابطه عکسی بین محتوای آکریل‌آمید و ملانوئیدین در هسته خرمای برشته شده مشاهده شد. به عنوان مثال هسته خرمای شاهانی آکریل‌آمید کم و ملانوئیدین بالایی داشت. به‌طور مشابه، مقادیر بالای آکریل‌آمید و کمتر ملانوئیدین در هسته خرمای کبکاب مشاهده شد. در نتیجه نتایج حاصل از محتوای ملانوئیدین تا حد زیادی تاییدکننده روند میزان آکریل‌آمید در انواع هسته خرما است.

تعیین پارامترهای رنگی

داده‌های مربوط به رنگ پودرها و نوشیدنی موکا تهیه شده از قهوه عربیکا و انواع واریته هسته خرما در جدول ۴ آمده است. نتایج نشان داد مقدار L^* در قهوه عربیکا به‌طور قابل توجهی کمتر از انواع مختلف هسته خرما است که بیانگر بیشتر بودن درجه برشتگی قهوه نسبت به هسته خرما می‌باشد. همچنین بین نمونه‌های پودر هسته خرمای برشته، بیشترین مقدار L^* مربوط به هسته خرما شاهانی و کمترین مربوط به هسته خرمای استعمران و مضافتی بود.

جدول ٤- پارامترهای رنگ نمونه‌های آسیاب شده و نوشیدنی موکا تهیه شده از قهوه عربیکا و انواع هسته خرمای برشته

Table 4- Color parameters of ground samples and Moka brew prepared from Arabica coffee and roasted date seeds

	Samples نمونه‌ها	L*	a*	b*
Ground sample نمونه آسیاب شده	Arabica coffee قهوه عربیکا	19.97± 0.23ᵃ	7.43± 0.06ᵃ	9.73± 0.08ᵃ
	Kabkab کبکاب	31.14 ±0.09ᵉ	13.31± 0.16ᵈ	19.61 ±0.15ᵈ
	Estamaran استعمران	26.34 ±0.14ᵇ	9.79± 0.07ᵇ	15.00 ±0.01ᵇ
	Zahedi زاهدی	29.39± 0.23ᵈ	11.24± 0.11ᶜ	17.71± 0.10ᶜ
	Shahani شاهانی	34.15 ±0.18ᶠ	15.74 ±0.12ᵉ	22.48 ±0.33ᵉ
	Mazafati مضافتی	26.97 ±0.26ᶜ	9.63 ±0.16ᵇ	15.43 ±0.20ᵇ
Moka brew نوشیدنی موکا	Arabica coffee قهوه عربیکا	29.61 ±0.39ᵃ	29.97± 0.15ᵉ	20.66± 0.23ᵃ
	Kabkab کبکاب	73.75± 0.49ᶜ	3.72 ±0.06ᵃ	30.32± 0.14ᵉ
	Estamaran استعمران	72.02± 1.05ᵇ	4.09 ±0.07ᵇ	27.38± 0.17ᵇ
	Zahedi زاهدی	73.50 ±0.02ᶜ	4.79± 0.06ᶜ	29.49± 0.25ᵈ
	Shahani شاهانی	74.54± 0.21ᵈ	6.45 ±0.12ᵈ	32.30 ±0.17ᶠ
	Mazafati مضافتی	72.54± 0.21ᶜ	4.51± 0.11ᶜ	28.61 ±0.02ᶜ

*حروف(a,b,..) در هر ستون، بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

* Different letters in a column denote significant differences (p<0.05)

بررسی داده‌ها نشان داد که پارامترهای a^* و b^* تا حد زیادی از الگوی ملانوئیدین پیروی می‌کنند. به نحوی که با افزایش میزان a^* و b^* و افزایش شدت رنگ قهوه‌ای، میزان ملانوئیدین هم در نمونه‌ها افزایش یافته است. هسته خرمای شاهانی با بالاترین محتوای ملانوئیدین، بالاترین میزان a^* و b^* را نیز به خود اختصاص داد. به شکل مشابه، هسته خرمای استعمران، از کمترین میزان a^* و b^* و

ملانوئیدین برخوردار بود. Şenyuva و همکاران (۲۰۰۵) رابطه مستقیمی بین a^* و آکریل‌آمید پیدا کردند که با نتایج ما در تضاد بود (Şenyuva and Gökmen 2005). بعد از تهیه نوشیدنی، پارامترهای رنگی به شدت تحت تاثیر قرار گرفتند، خصوصا پارامتر L^* با افزایش قابل توجهی همراه بود که بیانگر روشن‌تر بودن قهوه موکای تهیه شده از هسته خرما در مقایسه با دانه عربیکا بود. این نتایج می‌تواند با کمتر بودن نرخ استخراج ترکیبات رنگی از جمله ترکیبات رنگی از هسته خرما در مقایسه با قهوه عربیکا توجیه شوند. همچنین رنگ نوشیدنی به‌طور محسوسی زردتر شد که با کاهش a^* و افزایش b^* همراه بود.

Ghnimi و همکاران (۲۰۱۵)، تغییرات پارامترهای رنگی سه گونه هسته خرما را طی برشته شدن به مدت شش ساعت و نیم، بررسی کردند (Ghnimi et al. 2015). طبق نتایج این پژوهشگران طی فرآیند برشته کردن مقدار L^* از ۴۷ به ۱۵، a^* از ۱۶ به حدود ۱ و b^* از ۲۴ به نزدیک صفر کاهش یافت که این مقادیر در محدوده نتایج پژوهش حاضر قرار داشت. همچنین در مقالات مقدار L^* قهوه با درجه برشتگی متوسط ۱۸ تا ۱۹ گزارش شده که با نتایج ما همخوانی دارد (Herawati et al. 2019). در پژوهش Fikry و همکاران (۲۰۱۹)، مقادیر پارامترهای L^*، a^* و b^* پودر هسته خرما با درجه برشتگی متوسط تیره[1] به‌ترتیب ۴۱- ۳۷، ۱۵ -۱۴ و ۲۰ -۱۹ گزارش شد که تقریبا با مقادیر به‌دست آمده از هسته خرما شاهانی و کبکاب همخوانی دارد (Fikry et al. 2019a).مقادیر به‌دست آمده از سایر گونه‌های هسته خرما کمتر از مقادیر گزارش شده توسط این پژوهشگران بود. Babiker و همکاران (۲۰۲۰) نیز تاثیر شدت فرایند برشته کردن را بر پارامترهای رنگ هسته خرما بررسی کرده و نشان دادند که با افزایش شدت تیمار حرارتی، کلیه پارامترهای رنگی به‌طور محسوسی کاهش پیدا می‌کنند (Babiker et al. 2020). آنها، میزان پارامترهای L^*، a^* و b^* را به ترتیب ۳۷- ۲۷، ۸- ۰/۷۶- و ۱۲- ۵ گزارش کردند. نتایج L^* آن‌ها با نتایج ما همخوانی داشت. این تفاوت بین نتایج پژوهش حاضر و یافته های سایر محققین، با توجه به استفاده از گونه‌های هسته خرما با ترکیبات شیمیایی متفاوت و نیز تفاوت شرایط برشته شدن قابل توجیه است.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش بهینه سازی شرایط دستگاه HPLC-PDA جهت آنالیز آکریل‌آمید در ۵ واریته هسته خرمای برشته شده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد استفاده از فاز متحرک آب/ استونیتریل (نسبت حجمی/ حجمی ۳:۹۷) با سرعت جریان ۰/۷ میلی‌لیتر بر دقیقه، منجر به جداسازی مطلوب پیک نمونه و تداخل‌گرها و ظهور پیک بلند، باریک و تمیز می‌شود. این روش بهینه، جهت آنالیز آکریل‌آمید نمونه‌های پودری و نوشیدنی موکا قهوه عربیکا و انواع هسته خرمای برشته شده مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاکی از حضور مقدار قابل توجه آکریل‌آمید در هسته خرما برشته شده بود به طوری که مقدار آن از ۲/۳۷ ±۱۲۹/۴۳ تا ۴/۱۵ ±۳۶۰/۹۹ میکروگرم بر کیلوگرم در گونه‌های مختلف متغیر بود. همچنین، محتوی آکریل‌آمید قهوه عربیکا به‌طور معنی‌داری بیشتر از انواع هسته خرما (۱۷/۴۴± ۱۸۲۵/۲۳) به‌دست آمد. بیشترین میزان ملانوئیدین به‌ترتیب مربوط به قهوه عربیکا، هسته خرما شاهانی، زاهدی، کبکاب، مضافتی و استعمران بود. بررسی نتایج ملانوئیدین نشان داد که در برخی گونه‌های هسته خرما (مانند شاهانی و کبکاب) بین میزان آکریل‌آمید و ملانوئیدین رابطه عکس وجود دارد. طبق ارزیابی نتایج پارامترهای رنگی، پارامترهای a^* و b^* تا حد زیادی از الگوی ملانوئیدین پیروی می‌کنند، به نحوی که با افزایش میزان a^* و b^* و افزایش شدت رنگ قهوه‌ای، میزان ملانوئیدین هم در نمونه‌ها افزایش یافت. همچنین بعد از تهیه نوشیدنی موکا شاهد افزایش معنی‌دار تمامی پارامترهای رنگی، به‌خصوص پارامتر L^* نسبت به پودر نمونه‌ها بودیم.

تشکر و قدردانی

تحقیق نویسنده مسئول از حمایت مالی دانشگاه فردوسی مشهد (۳/۵۱۶۹۴) برخوردار بوده است.

منابع

1. Al-Farsi M, Alasalvar C, Al-Abid M, Al-Shoaily K, Al-Amry M, Al-Rawahy F. 2007. Compositional and functional characteristics of dates, syrups, and their by-products. Food chemistry 104:943-947. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.12.051
2. Al-Farsi MA, Lee CY. 2008. Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds. Food chemistry 108:977-985. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.009
3. Alves RC, Soares C, Casal S, Fernandes J, Oliveira MBP. 2010. Acrylamide in espresso coffee: Influence of species, roast degree and brew length. Food chemistry 119:929-934. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.051

1 Medium dark

4. Babiker EE, Atasoy G, Özcan MM, Juhaimi FA, Ghafoor K, Ahmed IAM, Almusallam IA. 2020. Bioactive compounds, minerals, fatty acids, color, and sensory profile of roasted date (Phoenix dactylifera L.) seed. Journal of Food Processing and Preservation 44:e14495. https://doi.org/10.1111/jfpp.14495
5. Badoud F, Goeckener B, Severin K, Ernest M, Romero R, Alzieu T, Glabasnia A, Hamel J, Buecking M, Delatour T. 2020. Fate of acrylamide during coffee roasting and in vitro digestion assessed with carbon 14- and carbon 13-labeled materials. Food Chemistry 320:126601. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126601
6. Bagdonaite K, Derler K, Murkovic M. 2008. Determination of Acrylamide during Roasting of Coffee. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56:6081-6086.
7. Başaran B, Aydın F, Kaban G. 2020. The determination of acrylamide content in brewed coffee samples marketed in Turkey. Food Additives & Contaminants: Part A 37:280-287. https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1685133
8. Baum M, Böhm N, Görlitz J, Lantz I, Merz KH, Ternité R, Eisenbrand G. 2008. Fate of 14C-acrylamide in roasted and ground coffee during storage. Mol Nutr Food Res 52:600-608. https://doi.org/10.1002/mnfr.200700413
9. Bekedam EK ,Schols HA, van Boekel MAJS, Smit G. 2006. High Molecular Weight Melanoidins from Coffee Brew. Journal of agricultural and food chemistry 54:7658-7666. https://doi.org/10.1021/jf0615449
10. Bertuzzi T, Martinelli E, Mulazzi A, Rastelli S. 2020. Acrylamide determination during an industrial roasting process of coffee and the influence of asparagine and low molecular weight sugars. Food Chemistry 303:125372. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125372
11. Bijami A, Rezanejad F, Oloumi H, Mozafari H. 2020. Minerals, antioxidant compounds and phenolic profile regarding date palm (Phoenix dactylifera L.) seed development. Scientia Horticulturae 262:109017. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109017
12. Bouhlali EdT, Hmidani A, Bourkhis B, Khouya T, Ramchoun M, Filali-Zegzouti Y, Alem C. 2020. Phenolic profile and anti-inflammatory activity of four Moroccan date (Phoenix dactylifera L.) seed varieties. Heliyon 6:e03436. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03436
13. Cagliero C, Ho TD, Zhang C, Bicchi C, Anderson JL. 2016. Determination of acrylamide in brewed coffee and coffee powder using polymeric ionic liquid-based sorbent coatings in solid-phase microextraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1449:2-7. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.04.034
14. Dias RCE, Campanha FG, Vieira LGE, Ferreira LP, Pot D, Marraccini P, Benassi MDT. 2010. Evaluation of Kahweol and Cafestol in Coffee Tissues and Roasted Coffee by a New High-Performance Liquid Chromatography Methodology. Journal of agricultural and food chemistry 58:88-93.
15. Endeshaw H, Belay A. 2020. Optimization of the roasting conditions to lower acrylamide content and improve the nutrient composition and antioxidant properties of Coffea arabica. Plos one 15:e0237265.
16. FAO. 2019. Food and Agriculture Organization of the United Nations-Statistic Division https://www. fao. org/faost at/en/# data: QC.
17. Fikry M, Yusof YA, Al-Awaadh AM, Abdul Rahman R, Chin NL, Mousa E, Chang LS. 2019a. Effect of the Roasting Conditions on the Physicochemical, Quality and Sensory Attributes of Coffee-Like Powder and Brew from Defatted Palm Date Seeds. Foods 8.
18. Fikry M, Yusof YA, Al-Awaadh AM, Rahman RA, Chin NL. 2020. Prediction of the shelf-life of date seeds brew by integration of acceptability and quality indices. Journal of Food Measurement and Characterization 14:1158-1171. https://doi.org/10.1007/s11694-019-00365-4
19. Fikry M, Yusof YA, M Al-Awaadh A, Abdul Rahman R, Chin NL, Ghazali HM. 2019b. Antioxidative and quality properties of full-fat date seeds brew as influenced by the roasting conditions. Antioxidants 8:226.
20. Ghnimi S, Almansoori R, Jobe B, Hassan M, Afaf K. 2015. Quality evaluation of coffee-like beverage from date seeds (Phoenix dactylifera, L.). Journal of Food Processing and Technology 6.
21. Golshan Tafti A, Solaimani Dahdivan N, Yasini Ardakani S. 2017. Physicochemical properties and applications of date seed and its oil. International Food Research Journal 24.
22. Habib H, Platat C, AlMaqbali F, Ibrahim W. 2014. Date seed (Phoenix dactylifera) extract reduces the proliferation of pancreatic cancer cells, DNA damage and superoxide-dependent iron release from ferritin in vitro (829.20). The FASEB Journal 28:829.820. https://doi.org/10.1096/fasebj.28.1_supplement.829.20
23. Hamzalıoğlu A, Gökmen V. 2020. 5-Hydroxymethylfurfural accumulation plays a critical role on acrylamide formation in coffee during roasting as confirmed by multiresponse kinetic modelling. Food Chemistry 318:126467. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126467
24. Herawati D, Giriwono PE, Dewi FNA, Kashiwagi T, Andarwulan N. 2019. Critical roasting level determines bioactive content and antioxidant activity of Robusta coffee beans. Food science and biotechnology 28:7-14. https://doi.org/10.1007/s10068-018-0442-x
25. Hilary S, Tomás-Barberán FA, Martinez-Blazquez JA, Kizhakkayil J, Souka U, Al-Hammadi S, Habib H, Ibrahim W, Platat C. 2020. Polyphenol characterisation of Phoenix dactylifera L. (date) seeds using HPLC-mass spectrometry

and its bioaccessibility using simulated in-vitro digestion/Caco-2 culture model. Food chemistry 311:125969. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125969
26. Hirano M, Miura M, Gomyo T. 1996. A Tentative Measurement of Brown Pigments in Various Processed Foods. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 60:877-879. https://doi.org/10.1271/bbb.60.877
27. ICO. 2021. World coffee consumption: https://ico.org/prices/new-consumption-table.pdf.
28. Juhaimi FA, Ghafoor K, Özcan MM. 2012. Physical and chemical properties, antioxidant activity, total phenol and mineral profile of seeds of seven different date fruit (Phoenix dactylifera L.) varieties. International journal of food sciences and nutrition 63:84-89. https://doi.org/10.3109/09637486.2011.598851
29. Keunchkarian S, Reta M, Romero L, Castells C. 2006. Effect of sample solvent on the chromatographic peak shape of analytes eluted under reversed-phase liquid chromatogaphic conditions. Journal of Chromatography A 1119:20-28. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.02.006
30. Longhua X, Limin Z, Xuguang Q, Zhixiang X, Jiaming S. 2012. Determination of trace acrylamide in potato chip and bread crust based on SPE and HPLC. Chromatographia 75:269-274. https://doi.org/10.1007/s10337-012-2195-7
31. Lopes GR, Ferreira AS, Pinto M, Passos CP, Coelho E, Rodrigues C, Figueira C, Rocha SM, Nunes FM, Coimbra MA. 2016. Carbohydrate content, dietary fibre and melanoidins: Composition of espresso from single-dose coffee capsules. Food Research International 89:989-996. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.018
32. Madrau MA, Sanguinetti AM, Del Caro A, Fadda C, Piga A. 2010. Contribution of melanoidins to the antioxidant activity of prunes. Journal of Food Quality 33:155-170. https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2010.00328.x
33. Maqsood S, Adiamo O ,Ahmad M, Mudgil P. 2020. Bioactive compounds from date fruit and seed as potential nutraceutical and functional food ingredients. Food chemistry 308:125522. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125522
34. Mastovska K, Lehotay SJ. 2006. Rapid Sample Preparation Method for LC−MS/MS or GC−MS Analysis of Acrylamide in Various Food Matrices. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54:7001-7008.
35. Pastoriza S, Rufián-Henares JÁ, Morales FJ. 2012. Reactivity of acrylamide with coffee melanoidins in model systems. LWT - Food Science and Technology 45:198-20.۳
36. Pérez-Hernández LM, Chávez-Quiroz K, Medina-Juárez LÁ, Gámez Meza N. 2012. Phenolic characterization, melanoidins, and antioxidant activity of some commercial coffees from Coffea arabica and Coffea canephora. Journal of the Mexican Chemical Society 56.٤٣٥-٤٣٠: https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.08.004
37. Rattanarat P, Chindapan N, Devahastin S. 2021. Comparative evaluation of acrylamide and polycyclic aromatic hydrocarbons contents in Robusta coffee beans roasted by hot air and superheated steam. Food Chemistry 341:128266.
38. Samanipour B, Jalili M ,Rezaei K, Faraji R. 2019. Analysis of acrylamide from potato chips using an amino column followed by PDA as the detection system in HPLC. Quality Assurance and Safety of Crops & Foods 11:411-419. https://doi.org/10.3920/QAS2018.1436
39. Şenyuva HZ, Gökmen V. 2005. Study of acrylamide in coffee using an improved liquid chromatography mass spectrometry method: Investigation of colour changes and acrylamide formation in coffee during roasting. Food Additives and Contaminants 22:214-220.
40. Surma M, Sadowska-Rociek A, Cieślik E, Sznajder-Katarzyńska K .۲۰۱۷ .Optimization of QuEChERS sample preparation method for acrylamide level determination in coffee and coffee substitutes. Microchemical Journal 131:98-102. https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.11.021
41. Vignoli J, Bassoli D, Benassi MdT. 2011. Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. Food chemistry 124:863-868. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.008
42. Wang H, Lee AW, Shuang S, Choi MM. 2008. SPE/HPLC/UV studies on acrylamide in deep-fried flour-based indigenous Chinese foods. Microchemical Journal 89:90-97. https://doi.org/10.1016/j.microc.2007.12.006
43. Wenzl T, Karasek L, Rosen J, Hellenaes K-E, Crews C, Castle L, Anklam E. 2006. Collaborative trial validation study of two methods, one based on high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry and on gas chromatography–mass spectrometry for the determination of acrylamide in bakery and potato products. Journal of Chromatography A 1132:211-218. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.07.007
44. WHO. 1994. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some industrial chemicals 60:389-433.
45. Zhang Y, Jiao J ,Cai Z, Zhang Y, Ren Y. 2007. An improved method validation for rapid determination of acrylamide in foods by ultra-performance liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1142:194-198. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.12.086
46. Zheng C, Sun D-W, Zheng L. 2006. Recent developments and applications of image features for food quality evaluation and inspection–a review. Trends in Food Science & Technology 17:642-655.